

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

⑫ 公開特許公報(A) 平4-169597

⑬ Int. Cl.³
C 07 J 9/00
// A 61 K 31/575

識別記号 庁内整理番号
7180-4C
7252-4C

⑭ 公開 平成4年(1992)6月17日

審査請求 未請求 請求項の数 3 (全6頁)

⑮ 発明の名称 タウリン抱合型胆汁酸の精製方法

⑯ 特 願 平2-291942

⑰ 出 願 平2(1990)10月31日

⑱ 発 明 者 木 村 憲 行 福島県いわき市常磐三沢町傾城作1-2 東京田辺製薬株式会社いわき工場内
⑱ 発 明 者 三 上 一 利 福島県いわき市常磐三沢町傾城作1-2 東京田辺製薬株式会社いわき工場内
⑱ 発 明 者 関 根 富 男 福島県いわき市常磐三沢町傾城作1-2 東京田辺製薬株式会社いわき工場内
⑲ 出 願 人 東京田辺製薬株式会社 東京都中央区日本橋本町2丁目2番6号
⑳ 代 理 人 弁理士 松山 直行

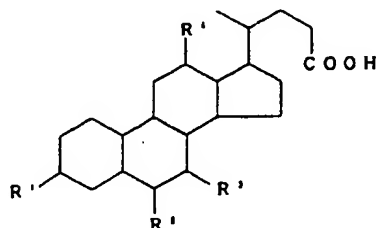
明 細 書

1. 発 明 の 名 称

タウリン抱合型胆汁酸の精製方法

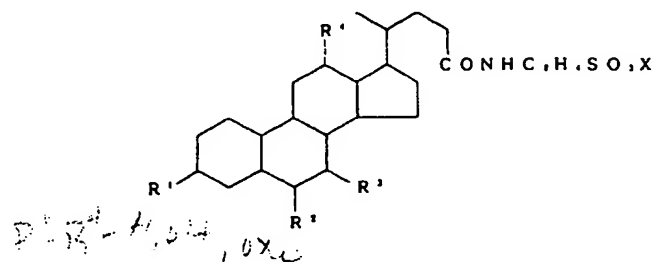
2. 特 許 請 求 の 範 囲

(1) 一 般 式



(式中R¹、R²、R³及びR⁴は水素、保護基を有してもよいα-若しくはβ-ヒドロキシ基又はケトン基を表す。)で表される胆汁酸を原料とし、これにタウリンを抱合させて、一般式

(以下余白)



(式中R¹、R²、R³及びR⁴は水素、保護基を有してもよいα-若しくはβ-ヒドロキシ基又はケトン基を表し、Xは水素又はアルカリ金属を表す。)で表されるタウリン抱合型胆汁酸を生成させる反応の後処理工程において、反応終了液から有機溶媒及び未反応原料を除去して生成する水溶液を逆相系合成樹脂またはODSシリカゲルを充填したカラムに通液し、次いで有機溶媒単独又は有機溶媒と水との混合液で溶離することの特許とするタウリン抱合型胆汁酸の精製方法。

(2) 溶離に用いる有機溶媒が水溶性溶媒である特許請求の範囲(1)記載のタウリン抱合型胆汁酸の精製方法。

(3) 逆相系合成樹脂またはODSシリカゲルがタウリン抱合型胆汁酸に対して2～20倍(V/W)である特許請求の範囲(1)記載のタウリン抱合型胆汁酸の精製方法。

3. 発明の詳細な説明

産業上の利用分野

本発明は、血中脂質低下作用やカルシウム吸収促進作用などの薬理作用を示すタウロウルソデオキシコール酸ナトリウム、タウロコール酸ナトリウム、タウロβ-ムリコール酸などを含むタウリン抱合型胆汁酸の精製方法に関する。

詳しくは、抱合反応後のタウリン抱合型胆汁酸中の未反応のフリー胆汁酸を除去した水溶液を、逆相系合成樹脂またはオクタデシルシリル基を有するシリカゲル(以下「ODSシリカゲル」という。)を充填したカラムに通液し、次いで有機溶媒単独又は有機溶媒と水との混合液で溶離させることにより、高純度のタウリン抱合型胆汁酸を得る方法である。

従来の技術

従来の方法では、脱塩操作を繰り返すため操作が煩雑であり、かつ未反応タウリン及び無機塩を完全に除去することは不可能であった。また、僅かに含まれるタウリン抱合型胆汁酸の類縁不純物は目的物と物性が近似するため分離除去することが困難であった。

問題を解決するための手段

本発明者らは、これらの問題点を解決するため鋭意研究した結果、混合酸無水物法またはEEDQ法により合成したタウリン抱合型胆汁酸の反応終了液から有機溶媒及び未反応の胆汁酸を除去した後の水溶液を、逆相系合成樹脂またはODSシリカゲルを充填したカラムに通液し、次いで有機溶媒単独又は有機溶媒と水との混合液で溶離させることにより、未反応タウリンや無機塩ばかりでなく類縁不純物も完全に除去でき、極めて高純度のタウリン抱合型胆汁酸が得られることを見いだした。

以下、本発明について詳述する。

まず、混合酸無水物法またはEEDQ法を用い

一般にアミノ酸と胆汁酸の抱合反応には、クロル炭酸エチルとトリエチルアミンを使用する方法(以下「混合酸無水物法」という。)、N-エトキシカルボニル-2-エトキシ-1,2-ジヒドロキノリンを使用する方法(以下「EEDQ法」という。)等が用いられるが、いずれも未反応のアミノ酸や反応副産物である大量の無機塩が反応終了液に含まれるため、これらの分離精製工程が必要である。中でもタウリン抱合型胆汁酸は、グリシン等のアミノ酸を抱合した胆汁酸に比較して、極めて水に溶解し易く有機溶媒に溶解しにくいので、これらの分離精製を完全に行うことは容易ではなかった。

これまで、タウリン抱合型胆汁酸の精製方法としては、日本化学雑誌、79、605(1958)、特開昭63-146895号が知られているが、いずれも無水アルコールを加え析出した結晶を濾別し、この工程を塩が析出しなくなるまで繰り返す方法である。

発明が解決しようとする問題点

胆汁酸とタウリンを反応させた後の未反応胆汁酸を水に不溶の有機溶媒、例えば酢酸エチル、n-ヘキサン、クロロホルム等で除去し、その後、溶媒を留去する。ついで蒸留水を加えて結晶に対して10～100倍、好ましくは30～40倍の水溶液とする。これを結晶の2～20(V/W)倍量の逆相系合成樹脂またはODSシリカゲルを充填したカラムにSV=0.2～4、好ましくはSV=0.4～0.6で通液する。ここで、SVは、樹脂またはODSシリカゲル容量に対する1時間の流出量の比率を表す。その後、樹脂またはODSシリカゲル容量の1～2倍の蒸留水で洗浄する。この時点で未反応タウリン及び無機塩は完全に除去される。

次に有機溶媒単独又は有機溶媒と水との混合液で目的物を溶離させる。ここでの有機溶媒は水性のもの、例えばメタノール、エタノール、アセトン等が用いられる。例えばメタノールを用いる場合、混合液濃度は10～100%メタノールが良く、タウロウルソデオキシコール酸ナトリウム

の場合は40～50%メタノールで、タウロコール酸ナトリウムの場合は30～40%メタノールで溶離する方法が通している。

一方、一般に反応終了後のタウリン抱合型胆汁酸を薄層クロマトグラフで分析すると未反応胆汁酸の他に2種類の不純物が0.1～0.2%検出される。これら不純物を除去精製する場合にも、本発明の精製方法は極めて有効である。

例えば、シリカゲル薄層板を用いた薄層クロマトグラフにおいて、組成比がクロロホルム：エタノール：酢酸エチル：酢酸：水＝8：6：5：4：1（V：V）の展開溶媒を用いた場合、タウリン抱合型胆汁酸のスポットの上下部にその類縁不純物が検出される。このうち、下部に展開される不純物は蒸留水洗浄の際に溶出し、また、上部に展開される不純物は水－メタノール混合液による溶出でも合成樹脂またはODSシリカゲルに吸着され溶離しない。これにより、これらの類縁不純物が除去され、目的物が高純度で得られることとなる。

を除去する。蒸留後の水溶液を750mlに希釈し、希塩酸でpHを中性に戻し、逆相系合成樹脂HP-21を250ml充填したカラムにSV＝0.5で通液する。次いで蒸留水250mlで洗浄後、50%メタノール1000mlで溶離する。得られた水溶液をスプレードライしてタウロウルソデオキシコール酸ナトリウム27.2gを得た（収率：81.9%）。

塩：0.1%以下

タウリン：0.1%以下

薄層クロマトグラフィーによる純度

：99.9%以上

（展開溶媒組成はクロロホルム：エタノール：

酢酸エチル：酢酸：水＝8：6：5：4：1）

実施例2

コール酸3kgを酢酸エチル3ℓに溶解し、トリエチルアミン1.17ℓ（1.15等量）を加え攪拌する。混合液を10℃まで冷却し、クロル炭酸エチルを0.81ℓ（1.15等量）滴下する。次いで、タウリン1.05kg（1.15等量）を

本発明で用いられる逆相系合成樹脂またはODSシリカゲルとしては、例えば商品名HP-21、HP-20、SP-206、SP-800（三菱化成側）、XAD-2、XAD-2000（オルガノ側）、Silica Gel ODS-G-5、Silica Gel ODS-Q-3（富士ゲル販売側）が挙げられる。

以下、本発明を実施例により説明する。

実施例1

ウルソデオキシコール酸25gをジオキサン250mlに溶解し、トリエチルアミン10.2ml（1.15等量）を加え攪拌する。混合液を10℃まで冷却し、クロル炭酸エチルを7.0ml（1.15等量）滴下する。次いで、タウリン9.17g（1.15等量）を1規定水酸化ナトリウム6ℓに溶解した水溶液を滴下する。1時間攪拌後減圧蒸留して溶媒を除去し、希塩酸でpH6に調整した後、酢酸エチルで未反応ウルソデオキシコール酸を抽出する。得られた水溶液に水酸化ナトリウムを4g加え、減圧蒸留してトリエチルアミン

1規定水酸化ナトリウム0.8ℓに溶解した水溶液を滴下する。1時間攪拌後減圧蒸留して溶媒を除去し、希塩酸でpH6に調整した後、酢酸エチルで未反応コール酸を抽出する。得られた水溶液に水酸化ナトリウムを480g加え、減圧蒸留してトリエチルアミンを除去する。蒸留後の水溶液を90ℓに希釈し、希塩酸でpHを中性に戻し、逆相系合成樹脂HP-20を30ℓ充填したカラムにSV＝0.5で通液する。次いで蒸留水30ℓで洗浄後、50%メタノール120ℓで溶離する。得られた水溶液をスプレードライしてタウロコール酸ナトリウム3.24kgを得た（収率：84.1%）。

塩：0.1%以下

タウリン：0.1%以下

薄層クロマトグラフィーによる純度

：99.9%以上

（展開溶媒組成は実施例1と同様）

実施例3

ケノデオキシコール酸25gをジオキサン25

0 mlに溶解し、EEDQ 16.5 ml (1.05等量)を加え攪拌する。次いで、タウリン9.17 g (1.15等量)を1規定水酸化ナトリウム66 mlに溶解した水溶液を滴下する。60℃で3時間攪拌後減圧蒸留して溶媒留去し、希塩酸でpH 8に調整した後、酢酸エチルで反応副産物のキノリンを除去し、pH 6で未反応ケノデオキシコール酸を抽出する。得られた水溶液を減圧蒸留して溶媒を除去する。蒸留後の水溶液を750 mlに希釈し、希塩酸でpHを中性に戻し、逆相系合成樹脂HP-21を250 ml充填したカラムにSV=0.5で通液する。次いで蒸留水250 mlで洗浄後、70%メタノール1000 mlで溶離する。得られた水溶液をスプレードライしてタウロケノデオキシコール酸ナトリウム29.9 gを得た(収率:90.0%)。

塩 : 0.1%以下

タウリン : 0.1%以下

薄層クロマトグラフィーによる純度 : 99.9%以上

塩 : 0.1%以下

タウリン : 0.1%以下

薄層クロマトグラフィーによる純度 : 99.9%以上

(展開溶媒組成は実施例1と同様)

実施例5

ヒオコール酸25 gをテトラヒドロフラン250 mlに溶解し、トリエチルアミン9.85 ml (1.15等量)を加え攪拌する。混合液を10℃まで冷却し、クロル炭酸エチルを6.8 ml (1.15等量)滴下する。次いで、タウリン8.85 g (1.15等量)を1規定水酸化ナトリウム64 mlに溶解した水溶液を滴下する。1時間攪拌後減圧蒸留して溶媒留去し、希塩酸でpH 8に調整した後、酢酸エチルで未反応ヒオコール酸を抽出する。得られた水溶液に水酸化ナトリウムを4 g加え、減圧蒸留してトリエチルアミンを除去する。蒸留後の水溶液を750 mlに希釈し、希塩酸でpHを中性に戻し、逆相系合成樹脂HP-21を250 ml充填したカラムにSV=0.5で通液する。

(展開溶媒組成は実施例1と同様)

実施例4

β -ムリコール酸25 gをジオキサン250 mlに溶解し、トリエチルアミン9.85 ml (1.15等量)を加え攪拌する。混合液を10℃まで冷却し、クロル炭酸エチルを6.8 ml (1.15等量)滴下する。次いで、タウリン8.85 g (1.15等量)を1規定水酸化ナトリウム64 mlに溶解した水溶液を滴下する。1時間攪拌後減圧蒸留して溶媒留去し、希塩酸でpH 8に調整した後、酢酸エチルで未反応 β -ムリコール酸を抽出する。得られた水溶液に水酸化ナトリウムを4 g加え、減圧蒸留してトリエチルアミンを除去する。蒸留後の水溶液を750 mlに希釈し、希塩酸でpHを中性に戻し、逆相系合成樹脂HP-21を250 ml充填したカラムにSV=0.5で通液する。次いで蒸留水250 mlで洗浄後、40%メタノール1000 mlで溶離する。得られた水溶液をスプレードライしてタウロ β -ムリコール酸ナトリウム27.0 gを得た(収率:81.6%)。

次いで蒸留水250 mlで洗浄後、50%メタノール1000 mlで溶離する。得られた水溶液をスプレードライしてタウロヒオコール酸ナトリウム27.5 gを得た(収率:83.2%)。

塩 : 0.1%以下

タウリン : 0.1%以下

薄層クロマトグラフィーによる純度 : 99.9%以上

(展開溶媒組成は実施例1と同様)

発明の効果

本発明の精製方法によれば、未反応原料や無機塩ばかりでなく類縁不純物も完全に除去することができ、極めて高純度のタウリン抱合型胆汁酸を得ることができる。

特許出願人 東京田辺製薬株式会社

代理人 弁理士 松山直行

手続補正書(自発)

平成4年1月9日

特許庁長官 深沢 巨 殿

1. 事件の表示

平成2年特許願第291942号

2. 発明の名称

タウリン抱合型胆汁酸の精製方法

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

東京都中央区日本橋本町二丁目2番6号

東京田辺製薬株式会社

代表者 野部晃司

4. 代理人 〒115

東京都北区赤羽北2丁目33番3号

東京田辺製薬株式会社研究開発本部内

電話 03(3905)8005

(9283) 井原 松山直行

5. 補正の対象

願書の「特許出願人」及び「発明の範囲」の欄

者」の欄並びに明細書の「特許請求の範囲」及び「発明の詳細な説明」の欄

7. 補正の内容

(1) 願書を別紙の通り補正する。

(2) 明細書の特許請求の範囲を別紙のとおり補正する。

(3) 明細書第8頁第12行に「1. 15等量」とあるのを「対原料胆汁酸の1. 15倍モル、以下単に1. 15倍モルと表す。」と補正する。

(4) 明細書第8頁第14行に「等量」とあるのを「倍モル」と補正する。

(5) 明細書第8頁第15行に「等量」とあるのを「倍モル」と補正する。

(6) 明細書第9頁第17行に「等量」とあるのを「倍モル」と補正する。

(7) 明細書第9頁第19行に「等量」とあるのを「倍モル」と補正する。

(8) 明細書第9頁第20行に「等量」とあるのを「倍モル」と補正する。

(9) 明細書第11頁第1行に「等量」とあるのを

「倍モル」と補正する。

(10) 明細書第11頁第3行に「等量」とあるのを「倍モル」と補正する。

(11) 明細書第12頁第5行に「等量」とあるのを「倍モル」と補正する。

(12) 明細書第12頁第6行に「等量」とあるのを「倍モル」と補正する。

(13) 明細書第12頁第8行に「等量」とあるのを「倍モル」と補正する。

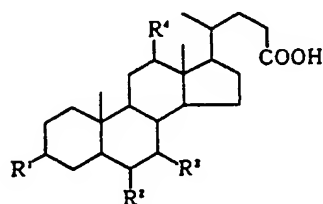
(14) 明細書第13頁第9行に「等量」とあるのを「倍モル」と補正する。

(15) 明細書第13頁第11行に「等量」とあるのを「倍モル」と補正する。

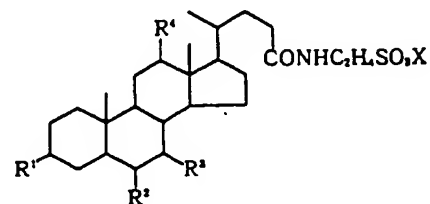
(16) 明細書第13頁第12行に「等量」とあるのを「倍モル」と補正する。

2. 特許請求の範囲

(1) 一般式



(式中 R^1 、 R^2 、 R^3 及び R^4 は水素、保護基を有してもよい α -若しくは β -ヒドロキシ基又はケトン基を表す。) で表される胆汁酸を原料とし、これにタウリンを抱合させて、一般式



(式中 R^1 、 R^2 、 R^3 及び R^4 は水素、保護基を有してもよい α -若しくは β -ヒドロキシ基又はケトン基を表す。)

ン基を表し、Xは水素又はアルカリ金属を表す。) で表されるタウリン抱合型胆汁酸を生成させる反応の後処理工程において、反応終了液から有機溶媒及び未反応原料を除去して生成する水溶液を逆相系合成樹脂またはODSシリカゲルを充填したカラムに通液し、次いで有機溶媒単独又は有機溶媒と水との混合液で溶離することを特徴とするタウリン抱合型胆汁酸の精製方法。

(2) 溶離に用いる有機溶媒が水溶性溶媒である特許請求の範囲(1)記載のタウリン抱合型胆汁酸の精製方法。

(3) 逆相系合成樹脂またはODSシリカゲルがタウリン抱合型胆汁酸に対して2～20倍(V/W)である特許請求の範囲(1)記載のタウリン抱合型胆汁酸の精製方法。